

(19) Japanese Patent Office

(12) Publication of Unexamined Patent Application (A) (11) Kokai Number
2004-201641
(P2004-201641A)

(43) Date of Publication: **July 22, 2004**

(51) Int. Cl. ⁷	FI		Theme Code (Reference)
C12N 15/09	C12N	15/00	A 4B024
C12Q 1/68	C12Q	1/68	ZNAA 4B063
G01N 33/53	G01N	33/53	M
G01N 33/566	G01N	33/566	
G01N 33/569	G01N	33/569	A

Request for Examination: Not Requested. Number of Claims: 10 OL (18 Pages Total)

(21) Application Number: 2002-377820 (P2002-377820)	(71) Applicant: 591122956 Mitsubishi Chemical Medience Corporation 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku Tokyo
(22) Filing Date: December 26, 2002	(74) Agent: 100088904 Takashi Shohji, Attorney
	(72) Inventor: Hiroaki Ishiko 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku Tokyo
	(72) Inventor: Osamu Hashimoto 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku Tokyo
	F Term (Reference) 4B024 AA11 CA01 HA12 4B063 QA18 QA19 QQ07 QQ43 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34 QX01 QX10

(54) [Title of the Invention] Method of Detecting Fungus

(57) [Abstract]

[Problem] Provide a method for readily detecting fungus and identifying the fungal genus or fungal strain.

[Means for Solving the Problem] Focus on common sequences in the fungal genome and specific sequences in the fungal genus or fungal strain, and use a primer composed of oligonucleotides having the base sequences indicated by the specific sequences when employing nucleic acid amplification means to detect the fungi attributed to deep fungal infection in humans. Also, identify and quantify the fungal genus or fungal strain of the deep fungus by analyzing the melting temperature of the amplified nucleic acid. Furthermore, identify the fungal strain by analyzing the gene lineage from the base sequences of the amplified product.

[Selected Drawings] None

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-201641

(P2004-201641A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int.Cl.⁷

C 12 N 15/09
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53
G 01 N 33/566
G 01 N 33/569

F I

C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53
G 01 N 33/566
G 01 N 33/569

テーマコード(参考)

A
Z N A A
M
A

4 B 0 2 4
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号

特願2002-377820(P2002-377820)

(22) 出願日

平成14年12月26日(2002.12.26)

(71) 出願人

591122956
株式会社三菱化学ビーシーエル

東京都板橋区志村3-30-1

(74) 代理人

100088904

弁理士 庄司 隆

(72) 発明者

石古 博昭

東京都板橋区志村3丁目30番1号

(72) 発明者

橋本 修

東京都板橋区志村3丁目30番1号

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA12

4B063 QA18 QA19 QQ07 QQ43 QR08

QR32 QR42 QR55 QR62 QS25

QS34 QX01 QX10

(54) 【発明の名称】 真菌検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 真菌を迅速に検出し、真菌の属または菌種同定を可能とする方法を提供する。

【解決手段】 真菌類のゲノムに共通配列があることおよび真菌の属または菌種による特異的な配列があることに着目し、特定の配列で示される塩基配列のオリゴヌクレオチドからなるプライマーを用いて、核酸増幅手段により、ヒトの深在性真菌症の起因菌検出をこなう。また、増幅した核酸の融解温度を解析することにより、深在性真菌の属または菌種の同定と定量を行う。さらにその増幅産物の塩基配列から遺伝子系統解析による菌種同定をおこなう。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の群より選択される配列からなるオリゴスクレオチドを含む核酸増幅用プライマーを使用して核酸増幅手段を利用することを特徴とする真菌検出方法：

1) 真菌をコードする配列番号1に記載の塩基配列のうち、115位～138位、841位～860位、397位～417位、694位～678位、及びその相補鎖の領域から選択され、配列番号1及び／又はその相補鎖の連続する塩基を少なくとも5以上含むオリゴスクレオチド。

2) 真菌をコードする配列のうち258、268若しくは288リボソームRNA又は前記258、268若しくは288リボソームRNAをコードするDNAから選択され、連続する塩基を少なくとも5以上含むオリゴスクレオチド。

3) 配列番号2～5で表される塩基配列及び／又はその相補鎖からなるオリゴスクレオチド。

4) 前記1)～3)のいずれか1に記載のオリゴスクレオチドとストリンジェントな条件下ハイブリダイズしうるオリゴスクレオチド。

5) 前記1)～4)のいずれか1に記載のオリゴスクレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含み、プライマー機能を有するオリゴスクレオチド。

【請求項 2】

配列番号2～5で表される塩基配列のオリゴスクレオチドからなるプライマーのうちセンス側プライマー及びアンチセンス側プライマーを適宜選択したものを作成するプライマーセットとして使用し、核酸増幅手段を利用することを特徴とする真菌検出方法。

10

20

【請求項 3】

プライマーセットの組合せが、配列番号2及び3で表される塩基配列のオリゴスクレオチドからなるプライマーの組合せ、又は、配列番号4及び5で表される塩基配列のオリゴスクレオチドからなるプライマーの組合せである請求項2に記載の真菌検出方法。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか1に記載の核酸増幅過程において、真菌の菌種特異的な配列を検出することによる菌種別真菌の検出方法。

【請求項 5】

真菌の菌種特異的な配列の検出が、増幅領域の塩基配列から選択されるプローブによる請求項4に記載の菌種別真菌の検出方法。

30

【請求項 6】

真菌の菌種特異的な配列の検出が、核酸の融解温度の測定である請求項4に記載の菌種別真菌の検出方法。

【請求項 7】

請求項4～6のいずれか1に記載の菌種別真菌の検出方法により真菌の遺伝子系統解析を行う真菌菌種の同定方法。

【請求項 8】

請求項4～6のいずれか1に記載の菌種別真菌の検出方法により菌種特異的な配列を検出し、該検出データがコンピュータにより処理され、真菌類の遺伝子系統解析データベースに基づいて真菌菌種の同定を行う方法。

40

【請求項 9】

菌種特異的な配列が施設において検出され、得られた検出データが電気通信回路を通じて真菌菌種の解析センターに送信され、請求項7又は8に記載の方法によって処理されることにより、真菌類の遺伝子系統解析データベースに基づいて真菌菌種が同定され、その結果が電気通信回路を経て施設にフィードバックされる真菌種同定サービスのビジネス方法。

【請求項 10】

請求項1～6の何れか1の検出方法又は真菌菌種の同定方法に使用される試薬を含む遺伝子機能の変異の迅速測定用試薬キット。

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、真菌検出方法に関する。具体的には、真菌の25S、26S若しくは28SリボソームRNA（以下、各々「25S rRNA」、「26S rRNA」、「28S rRNA」という。）遺伝子をコードするDNA領域の約1000bpにおいて保存されている塩基配列に基づいて真菌の核酸を増幅して検出する方法に関し、さらに遺伝子系統解析による真菌菌種の同定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

真菌類は、Phycomycetes（藻菌類）、Ascomycetes（子嚢菌類）、Basidiomycetes（担子菌類）、Fungi imperfecti（不完全菌類）に分類されるが、ヒトに病原性のあるのは殆ど不完全菌類に属する。この不完全菌類は、ほかの真菌と異なって有性生殖を行わず、無性生殖に終始する。不完全菌類でヒトに病原性のあるのは、その形態の類似性をもとにして、酵母及び酵母様真菌と、糸状菌及び糸状菌様真菌とに大別される。真菌症は、病巣の部位によって大きく2つに分けられる。表在性真菌（皮膚糸状菌症を含む）は、皮膚、毛髪、つめなどにみられ、慢性の経過をとり治療しにくいことは多いが、深部組織に波及して重症感染に発展することはまれである。深在性真菌症は皮膚組織、内部臓器組織、骨などを侵し、汎発性真菌症に発展することが多く、したがって重篤なものが多い。また、真菌症は原因となる真菌の由来によって内因性真菌症と外因性真菌症に分けてよぶことがある。前者は原因菌が健常人の体内にもしばしば常在しており、そこになんらかの誘因が働いて発症するものなので、Actinomyces症、カンジダ症などがこれである。一方、外因性真菌症は原因菌が本来健常人には存在せず、外部からの感染によって発症するもので、アスペルギルス症、Nocardia症、Histoplasma症、クリプトコッカス症などがある（臨床検査法提要、金原出版株式会社、第31版、1998年、p. 1056）。

10

20

30

【0003】

ヒトの主な深在性真菌症の起因菌として、カンジダ症のCandida albicans、C. parapsilosis、C. tropicalis、C. krusei、アスペルギルス症のAspergillus flavus、A. fumigatus、A. niger、クリプトコッカス症のCryptococcus neoformans、接合菌症のRhizopus spp.があげられる。また、Trichosporon spp.やPseudallescheria boydiiやFusarium spp.、Rhodotorula rubraなどの真菌症も増加傾向にある。

【0004】

深在性の真菌症は日和見感染症であり、健常人のほとんどは不顕性で発症することはほとんどない。しかし、HIV感染によるエイズ発症あるいは臓器移植等による免疫機能低下において、真菌症の一つの深在性真菌症による重篤化が問題となっている。よって早期確定診断とそれに続く抗真菌剤の有効な投与が必須である。また効果のある抗真菌薬が治療に用いられているものの、副作用による患者負担もあり、迅速な治療効果を診断することも課題となっている。そのために迅速・簡便で信頼性の高い診断法が求められている。

40

【0005】

深在性真菌性の検査は一般に培養陽性率が低く、また初期における臨床症状はほとんどないことから、診断は臨床症状と経過観察、培養、画像、生検結果などによってなされている。深在性真菌症の診断法としては、さまざま血清診断キットがすでに開発され、▲1▼菌体成分（細胞壁マンナン、ガラクトマンナン、及び 膜グルクロノキシロマンナン）又は、菌体の体内における修飾産物（カンジダ易熱性糖蛋白）を抗原とした、抗原抗体反応による検出法と、▲2▼菌体成分（細胞壁β-グルカン）又は、真菌代謝産物（D-アラビニトール）を酵素反応によって検出する生化学的検出法がある。

40

【0006】

しかしながら、現行の血清診断キットは操作が煩雑であり、また検出における特異性、及び感度の点で問題が残っている。真菌症と診断された場合、広い抗真菌スペクトルをもつ抗真菌剤が用いられているが、既に開発されている薬剤によっては特定の抗真菌剤に対する感受性が異なるものもあることから、目的の抗真菌剤の選択には起因菌種の同定（属レ

50

ペル)が必要である。これまでの血清診断は、真菌共通の菌体成分を検出するため、属あるいは種を同定することが困難であった。真菌に対する治療薬は、菌種により効果が異なるものもあることから、疾患原因となる真菌の早期同定が必要とされている。

【0007】

この解決策として、より高感度かつ特異性に優れた真菌検出系として、遺伝子診断法の開発も試みられている。

各種真菌症の原因となる真菌のミトコンドリアに存在するチトクロームbの遺伝子に着目し、アスペルギルス属真菌を検出するため用いられる核酸を提供し、さらにそれを用いることによる簡便、迅速、特異的かつ高感度な深在性真菌症の原因菌、さらにはアスペルギルス属真菌の検出方法が報告されている(真菌類の検出用材料及び検出法:特許文献1)。

10

【0008】

また、深在性真菌症の原因菌、特にカンジダ属真菌及びクリプトコッカス属真菌を検出するため用いられる核酸を提供し、さらにそれを用いることによる簡便、迅速、特異的かつ高感度な検出方法が報告されている(真菌検出用核酸及びそれを用いた真菌の検出方法:特許文献2)。

【0009】

さらに、真菌のリボソームRNAのうち、18SリボソームRNA(18SrRNA)、28SリボソームRNA(28SrRNA)領域をコードするDNAをターゲットとした遺伝子増幅による真菌の検出例が報告されている(非特許文献1)。

20

しかしながら、これらは真菌の属あるいは幾つかの菌種を検出するのみで、広範囲の真菌同定は今だ実施されていない。

【0010】

【特許文献1】

国際公開 WO98/10073号パンフレット

【特許文献2】

特開2002 142774号公報

【非特許文献1】

J. Clin. Microbiol. 33, 2918-2919 (1995)

30

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、真菌を迅速に検出し、真菌の属又は菌種同定を可能とする方法を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、真菌類のゲノムに共通配列があること及び真菌の属又は菌種による特異的な配列があることに着目し、鋭意研究を重ねた結果、核酸増幅手段により、ヒトの深在性真菌症の起因菌検出と定量を行い、さらにその増幅産物の塩基配列から遺伝子系統解析による菌種同定を可能とすることを見出し、本発明を完成した。

40

【0018】

すなわち本発明は、以下の発明よりなる。

- 以下の群より選択される配列からなるオリゴヌクレオチドを含む核酸増幅用プライマーを使用して核酸増幅手段を利用することを特徴とする真菌検出方法; 1) 真菌をコードする配列番号1に記載の塩基配列のうち、115位～138位、841位～860位、397位～417位、694位～678位、及びその相補鎖の領域から選択され、配列番号1及び/又はその相補鎖の連続する塩基を少なくとも5以上含むオリゴヌクレオチド。

- 真菌をコードする配列のうち258、268若しくは288リボソームRNA又は前記258、268若しくは288リボソームRNAをコードするDNAから選択され、連続する塩基を少なくとも5以上含むオリゴヌクレオチド。

- 配列番号2～5で表される塩基配列及び/又はその相補鎖からなるオリゴヌクレオチ

50

ド。

4) 前記1)～3)のいずれか1に記載のオリゴスクレオチドとストリンジェントな条件下ハイブリダイズしするオリゴスクレオチド。

5) 前記1)～4)のいずれか1に記載のオリゴスクレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含み、プライマー機能を有するオリゴスクレオチド。

2. 配列番号2～5で表される塩基配列のオリゴスクレオチドからなるプライマーのうちセンス側プライマー及びアンチセンス側プライマーを適宜選択したものを1組のプライマーセットとして使用し、核酸増幅手段を利用することを特徴とする真菌検出方法。

3. プライマーセットの組合せが、配列番号2及び3で表される塩基配列のオリゴスクレオチドからなるプライマーの組合せ、又は、配列番号4及び5で表される塩基配列のオリゴスクレオチドからなるプライマーの組合せである前項2に記載の真菌検出方法。

4. 前項1～3のいずれか1に記載の核酸増幅過程において、真菌の菌種特異的な配列を検出することによる菌種別真菌の検出方法。

5. 真菌の菌種特異的な配列の検出が、増幅領域の塩基配列から選択されるプローブによる前項4に記載の菌種別真菌の検出方法。

6. 真菌の菌種特異的な配列の検出が、核酸の融解温度の測定である前項4に記載の菌種別真菌の検出方法。

7. 前項4～6のいずれか1に記載の菌種別真菌の検出方法により真菌の遺伝子系統解析を行う真菌菌種の同定方法。

8. 前項4～6のいずれか1に記載の菌種別真菌の検出方法により菌種特異的な配列を検出し、該検出データがコンピュータにより処理され、真菌類の遺伝子系統解析データベースに基づいて真菌菌種の同定を行う方法。

9. 菌種特異的な配列の検出が個別の検査機関においてなされ、得られた検出データが電気通信回路を経てセンター機関に集積され、前項7又は8に記載の方法によって処理されることにより、真菌類の遺伝子系統解析データベースに基づいて真菌菌種の同定を行い、結果が電気通信回路を経て個別の検査機関にフィードバックされる真菌種同定サービスのビジネス方法。

10. 前項1～6の何れか1の検出方法又は真菌菌種の同定方法に使用される試薬を含む遺伝子機能の変異の迅速測定用試薬キット。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明において、検出しうる真菌は特にヒトの主な深在性真菌症に起因する菌種であり、具体的にはCandida albicans、C. parapsilosis、C. tropicalis、C. krusei、C. glabrata、Aspergillus flavus、A. fumigatus、A. niger、Cryptococcus neoformans、Rhizopus arrhizus、Trichosporon beigelii、Pneumocystis cariniiが挙げられる。

【0015】

(真菌をコードする特定遺伝子領域の増幅)

本発明における真菌の検出は、測定検体である生物材料から遺伝子を抽出し、真菌をコードする特定遺伝子の領域の増幅を行うことによる。測定検体は、生物材料であり、微生物、生体細胞等の測定の標的とする真菌をコードする遺伝子を担持する可能性のある材料が対象となる。具体的には、鼻汁、肺洗浄液、拭い液、血液、尿、糞便等各測定の標的とする生理活性物質に応じて変更可能である。

遺伝子の抽出は、自体公知の方法により行うことができる。

特定遺伝子の増幅は、真菌に共通する部位に対応するプライマーを用いた核酸増幅手段により行われる。核酸増幅の手段は今日多様な方法が確立され、今後も開発されていくであろうが、本発明では特に限定されるものではない。具体的にはPCR法(Polymerase Chain Reaction法、Science, 280:1850-1854, 1985)やNASBA法(Nucleic Acid Sequence Based Amplification法、Nature, 350:91-92, 1991、特許第2648802号公報及び特許第59号公報記載)及びLAMP法(Loop mediated isothermal amplification of DNA増幅法

10

20

30

40

50

、特開2001 242169号公報)などの核酸増幅方法を適用することができます。

【0016】

真菌をコードする特定遺伝子領域とは、配列番号1(GenBank Accession No. X70659)に表される配列を含む258rRNA、268rRNA若しくは288rRNAをコードする遺伝子領域をいう。また、本発明の検査方法に使用される核酸増幅用プライマーは、配列番号1に表される配列の100位～900位の位置及びその相補的な配列から選択される。

具体的には、以下の群より選択される配列からなるオリゴヌクレオチドを含むプライマーを使用することができます。

1) 真菌をコードする配列番号1に記載の塩基配列のうち、115位～138位、841位～860位、397位～417位、694位～678位、及びその相補鎖の領域から選択され、配列番号1及び／又はその相補鎖の連続する塩基を少なくとも5以上含むオリゴヌクレオチド。
10

2) 真菌をコードする配列のうち258、268若しくは288リボソームRNA又は前記258、268若しくは288リボソームRNAをコードするDNAから選択され、連続する塩基を少なくとも5以上含むオリゴヌクレオチド。

3) 配列番号2～5で表される塩基配列及び／又はその相補鎖からなるオリゴヌクレオチド。

4) 前記1)～3)のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジエントな条件下ハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド。

5) 前記1)～4)のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含み、プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド。
20

【0017】

また、本発明の検出方法に使用するプライマーは、配列番号2～5で表される配列を含むオリゴヌクレオチドからなるプライマーのうちセンス側プライマー及びアンチセンス側プライマーを適宜選択したものと1組のプライマーセットとして使用することができます。具体的には、配列番号2及び3で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドからなるプライマーの組合せ、又は、配列番号4及び5で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドからなるプライマーの組合せで使用することができます。

【0018】

(核酸の融解温度の検出による真菌の検出)

80

本発明の真菌の検出方法において、核酸の融解温度の差を利用して、真菌特異的な融解曲線を調べることにより真菌の検出を行うことができる。核酸の融解温度の測定は、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を採用することができます。例えば市販のライトサイクリー(LightCycler)を用いたリアルタイムPCR法により行うことができる。具体的には、目的とする遺伝子領域をPCR等の増幅手段により増幅したのち、95℃付近でDNAを一本鎖にしてから予め加えてある例えばSYBER Green、LC Red640等の標識色素を標識化したプローブと、蛍光標識されたプローブを42℃付近でアニールさせ、その後温度を変化させて、色素を標識化したプローブとが蛍光標識されたプローブから剥がされて蛍光が検出されなくなることにより融解温度を測定することができます。

【0019】

40

(リアルタイム法による標的核酸の定量)

核酸増幅方法で合成されたDNA鎖は自己の配列に対して相補的な配列をもつので、その大部分が塩基対結合を形成している。この特徴を利用して、増幅生成物の定量が可能である。エチジウムプロマイド、SYBER Green I、あるいはPico Greenのような2本鎖インタークーラーターである蛍光色素の存在下で本発明のプライマーを用いて核酸増幅を実施すれば、生成物の増加に伴って蛍光強度の増大が観察される。これをモニターすれば、閉鎖系でDNAの増幅と蛍光の増加が同時に追跡でき、核酸の定量ができる(臨床検査法提要、31版1318頁：特開2001 242169号公報参照)。例えばライトサイクリーによる定量は、PCR等の核酸増幅による二本鎖の副溝(minor groove)に反応液中のSYBR Green I、LC Red640等の標識色素が結合し、その蛍光強度を測定することにより行われる。該PCRのサイクル数
50

が増えるたびにDNAが増幅し、これに伴って増幅DNAにSYBR Green I等の標識色素が結合し、蛍光強度も上昇する。サイクル毎の蛍光強度を測定することで、核酸の定量が可能となる。

【0020】

(系統解析による真菌同定)

増幅産物の塩基配列の決定は公知の方法によって行うことができる。具体的には、特異的な塩基での化学的な切断を利用するマキシム-ギルバート法(Maxam Gilbert法)、シデオキシヌクレオチドにより特異な塩基でのDNA複製反応の停止を利用するサンガー法(Sanger法)などがよく利用されている。

本発明において、遺伝子系統解析は、真菌258、268若しくは288のrRNA遺伝子をコードするDNA内のプライマー増幅領域で行うことができる。遺伝子系統解析は公知の解析方法によって行うことができる。このような方法としては、Higgins法、UPGMA法、NJ法などがあげられる。また、これら的方法により解析を行うための市販ソフトがある(DNAsis: 日立ソフトウェアエンジニアリング、SINCA: 富士通等)。

【0021】

(真菌菌種の同定方法)

本発明の真菌検出方法により、菌種特異的な配列が検査機関等の施設において検出され、得られた検出データが、例えは電気通信回路を通じて真菌菌種の解析センターに送信され、真菌類の遺伝子系統解析データベースに基づいて真菌菌種の同定を行うことができる(図1)。

遺伝子系統解析は、本開発プライマーのいずれかの組み合わせによる増幅領域を用いて、例えは2パラメーター法を用いたNJ法(SINCA 富士通製)にて系統樹を作成し、行うことができる。作成された系統樹は、例えはブートストラップ法を用いた系統的評価により確認でき、真菌の同定をすることができる。

例えは、*Aspergillus*属7菌種、*Candida*属9菌種、*Cryptococcus*属8菌種、*Rhizopus*属3菌種、*Trichosporon*属2菌種、*Pneumocystis carinii*1菌種およびその他の真菌37菌種の計62菌種の真菌標準株の塩基配列はGenBankに登録されており、これらの菌株の258、268若しくは288のrRNA遺伝子をコードするDNAを用いて真菌菌種の同定を行うことができる。GenBankには上記以外の登録がされており、必要に応じて、目的遺伝子の塩基配列を用いることができる。

【0022】

上記本発明の真菌検出方法により得られた検出データに基づき、解析センターにおいて真菌菌種の同定が行われた結果を、電気通信回路を経て施設にフィードバックするという真菌種同定サービスのビジネス方法を提供することができる。

【0023】

(実施例)

本発明の理解を深めるために、以下に実施例を示して本発明を説明するが、本件特許発明は実施例の内容に何ら限定されるものではない。

【0024】

(実施例1) 真菌DNAの抽出

EDTA加採血管で採血した全血100μlの血球成分(赤血球、白血球等)を溶血させる。溶血液にDNA分解酵素(DNase)を加え、血球中から溶出したDNAを分解し遠心により真菌を集菌する。集積した真菌からProteinase(ロッシュ社製)により菌壁を溶解し、DNAを抽出した。

【0025】

(実施例2) 増幅のためのプライマー

抽出したDNAについて、配列番号2～5に示す塩基配列からなるプライマーを用いたPCRにより真菌288rRNAをコードする遺伝子領域を増幅した。PCRは、センス側に配列番号2あるいは配列番号4で表される配列からなるプライマーを、アンチセンス側に配列番号3あるいは配列番号5で表される配列からなるプライマーを使用して行った。増幅に使用する

10

20

30

40

50

プライマーは、以下に示す塩基配列からなるものを使用した。

【0026】

1) センス側プライマー : Fungi D1

5' GAT TGC CTC AGT AGC GGC GAG TGA 3' (配列番号2)

(配列番号1に記載する配列の内、115～138位の配列を表す。)

2) アンチセンス側プライマー : Fungi U1

5' GAT TGC CTC AGT AGC GGC GAG TGA 3' (配列番号3)

(配列番号1に記載する配列の内、860～841位に相補的な配列を表す。)

3) センス側プライマー : Fungi D

5' AGT GAT CGA AAG ATG AAA AG 3' (配列番号4)

10

(配列番号1に記載する配列の内、397～417位の配列を表す。)

4) アンチセンス側プライマー : Fungi U2

5' GTC CGT GTT TCA AGA CG 3' (配列番号5)

(配列番号1に記載する配列の内、694～678位に相補的な配列を表す。)

【0027】

(実施例8) リアルタイムPCR

ライトサイクラー(LightCycler)を用いて、リアルタイムPCRを実施した。

LightCycler FastStart DNAマスターSYBR Green I(ロッシュ社製)を使用した。試薬調製はキット添付説明書に従って行った。LightCycler FastStart酵素へLightCycler FastStart反応液SYBR Green I 60μlを加え、これをLightCycler FastStart DNAマスターSYBR Green I(マスターミックス)として使用した。反応は専用の反応容器のLightCyclerCapillariesを用い、これにマスターミックス2μlと配列番号2及び配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーそれぞれを1μM(最終濃度)、MgCl₂を8mM(最終濃度)、滅菌蒸留水7.4μlを加え15μlに調整し、サンプルDNA溶液5μlを添加して20μlで反応を行った。反応条件は、95℃10分の加熱後95℃10秒、55℃10秒、72℃20秒を50回行った。

20

反応終了後、增幅産物の融解曲線(Melting curve)を得るために65℃から一秒間に0.2℃ずつ98℃まで温度を上昇させた。

【0028】

(実験例1) PCR測定結果(プライマー評価)

ヒトの主な深在性真菌症の起因菌であるCandida albicans、C. parapsilosis、C. tropicalis、C. krusei、C. glabata、Aspergillus flavus、A. fumigatus、A. niger、Cryptococcus neoformans、Rhizopus arrhizus、Trichosporon beigelii、Pneumocystis cariniiの標準株12菌種について、標準株からDNAを抽出し、配列番号2及び3に記載の塩基配列からなるプライマーを用いてPCRを行った。

30

その結果、上記12菌種全てが検出され、その検出感度は1反応あたり10²～10¹コピー／チュープであった。このことから、本開発プライマーの塩基配列はヒトに感染し真菌症を呈す真菌に保存されていることが容易に推測できた。

【0029】

(実験例2) ライトサイクラーによる真菌の検出

ライトサイクラーのSYBR GreenによるリアルタイムPCRにより、真菌の特異的な融解曲線を検出できた。この融解曲線のピーク温度は二本鎖DNAの50%が一本鎖DNAになるときの温度、つまり融解温度(Tm)であり、増幅産物のGC含有量によりTmが決定される。今回使用した12種類の真菌の融解曲線から得られた各菌種のTm値は、Candida albicansは88.42℃、C. parapsilosisは84.64℃、C. tropicalisは85.57℃、C. kruseiは90.44℃、C. glabataは88.56℃、Aspergillus flavusは91.18℃、A. fumigatusは90.95℃、A. nigerは91.50℃、Cryptococcus neoformansは85.39℃、Rhizopus arrhizusは84.28℃、Trichosporon beigeliiは84.74℃、Pneumocystis cariniiは85.16℃であった。なお、Tm値は機器の性能上±1.5℃の変動がある。

40

このTm値の測定により目的産物の増幅物を確認することができ、PCR産物の同一性、特異産物と非特異産物を区別することが可能であることが確認された(図2)。

50

【0080】

(実験例3) 系統解析による真菌同定

増幅産物の塩基配列の決定は、サンガー法により行った。決定された増幅産物の塩基配列から、真菌28SrRNAをコードするDNA内の、プライマー増幅領域で遺伝子系統解析を行った。遺伝子系統解析は、N-J法により行った。また、本方法により解析を行うためにDNASIS(日立ソフトウエアエンジニアリング)の市販ソフトを使用した。

その結果、既知の真菌28SrRNAをコードするDNA内で本開発の解析領域による遺伝子系統解析では菌種同定が可能であった(図1)。

【0081】

(実験例4) ライトサイクラーによる定量(*Aspergillus fumigatus*)

PCRによる増幅核酸の二本鎖の副溝(minor groove)に、反応液中のSYBR Green Iを結合させることにより、PCRのサイクル数が増えるたびにDNAが増幅し、これに伴って増幅DNAにSYBR Green Iが結合し、蛍光強度も上昇する。この原理を利用して、真菌増幅領域断片を含むDNAの定量をライトサイクラーにより行う。PCRによる増幅は、配列番号4及び5に示されたプライマーを用いた。

【0082】

【表1】

	試料	理論値	実測値	サイクル数
①	Standard 1	6×10^6	5.827×10^6	13.48
②	Standard 2	1×10^5	8.785×10^4	18.58
③	Standard 3	3×10^3	4.291×10^3	22.26
④	Standard 4	1×10^2	8.195×10^1	27.08
⑤	陰性コントロール	0	-	-
⑥	試料1		1.337×10^3	23.68
⑦	試料2		3.994×10^1	27.97
⑧	陰性コントロール	0	-	-
⑨	陽性コントロール		8.060×10^5	15.88

【0083】

真菌増幅領域断片をプラスミドに組込んだDNAからなるスタンダードDNA(▲1▼～▲4▼)を表1の理論値の値となるように調整し、それについてライトサイクラーを用いて増幅曲線描いた(図3)。ライトサイクラーによる測定値と理論値の相関係数が0.98～1.00となり、PCRのサイクル数とDNA量の増幅によるSYBR Green Iの蛍光強度から真菌の定量が可能であることが確認された。陽性コントロール(▲9▼)陰性コントロール(▲5▼▲8▼)及び*Aspergillus fumigatus*を含む未知試料(▲6▼▲7▼)についても同様に増幅曲線を描いた。その結果、▲5▼および▲8▼については増幅が認められず、▲6▼および▲7▼については表1に示すDNAの計算値が得られ、真菌量を計ることが可能であった。

【0084】

10

20

30

40

50

(実験例5) ライトサイクラーによる定量 (*Cryptococcus neoformans*)

実験例4と同様に真菌増幅領域断片を含むDNAの定量をライトサイクラーにより行った。PCRによる増幅は、配列番号4及び5に示されたプライマーを用いた。

【0085】

【表2】

	試料	理論値	実測値	サイクル数
①	Standard 1	6×10^6	6.406×10^6	12.74
②	Standard 2	1×10^5	7.306×10^4	18.35
③	Standard 3	3×10^3	4.591×10^3	21.82
④	Standard 4	1×10^2	8.376×10^1	26.83
⑤	陰性コントロール	0	-	-
⑥	試料1		1.641×10^6	14.45
⑦	試料2		6.667×10^4	18.46
⑧	陰性コントロール	0	-	-
⑨	陽性コントロール		5.471×10^5	15.83

【0086】

真菌増幅領域断片をプラスミドに組込んだDNAからなるスタンダードDNA(▲1▼～▲4▼)を表1の理論値の値となるように調整し、それについてライトサイクラーを用いて増幅曲線描いた(図4)。ライトサイクラーによる測定値と理論値の相関係数が0.98～1.00となり、PCRのサイクル数とDNA量の増幅によるSYBR Green Iの蛍光強度から真菌の定量が可能であることが確認された。陽性コントロール(▲9▼)、陰性コントロール(▲5▼▲8▼)及び*Cryptococcus neoformans*を含む未知試料(▲6▼▲7▼)についても同様に増幅曲線を描いた。その結果、▲5▼および▲8▼については増幅が認められず、▲6▼および▲7▼については表2に示すDNAの計算値が得られ、真菌量を計ることが可能であった。

【0087】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の真菌検出方法により、生体試料より早期に真在性真菌の感染の有無を確認することができ、さらに、融解温度の測定及び系統樹解析により、検出された真菌の菌種の同定を早期に行うことが可能となる。

【0088】

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

〈110〉 MITSUBISHI KAGAKU BIO-CLINICAL LABORATORIES, INC.

〈120〉 Detection methods for Eumycetes

〈130〉 NP02-1117

10

〈160〉 5

〈170〉 PatentIn version 3.1

〈210〉 1

〈211〉 3442

20

〈212〉 DNA

〈213〉 Candida albicans

〈400〉 1

ttttatcaa ctgtcacac cagattatta cttaatagtc ttgacctca aatcaggtag 60

gactaccgc tgaacttaag catatcaata agcgaggaa aagaaaccaa cagggattgc 120

80

c tcagtagcg gcgagtgaag cggaaaagc tcaaatttga aatctggcgt ctggcgtc 180

cgagttgtaa ttgaagaag gtatcttg gcccggctt tgctatgtt ctttggaca 240

ggacgtcaca gaggttgaga atcccggtcg atgagatgac ccgggttgtt gtaaaggttcc 300

40

tttgacgagt cgagttgttt ggaaatgcag ctctaagtgg gtggtaaatt ccataaaag 360

ctaaatattg gcgagagacc gatagcgaac aagtacagtgt atggaaagat gaaaagaact 420
ttgaaaagag agaaaaaaag tacgtgaaat tggttggagg gaaggcgttgc agatcagact 480
tggtatTTTg catgtgtgtc tctcgggggc ggccgcgtgcg gtttaccggg ccagcatcg 540
tttgagccgg caggataatg gcccggaaat gtggcacggc ttctgtgtgc tggtatagcc 600
tctgacgata ctgcgcgcct agaccgagga ctgcgtttt ttacctagg atgttggcat 660
aatgatctta agtcggccgt ttgaaacac ggaccaagga gtctaacgtc tatgcgagtgt 720
tttgggtgtt aaaccgtac gcgtaatgaa agtgcgtgaa ggtggggcc cattagggt 780 20
caccatcgac cgatccgtat gtgttggat ggatttgagt aagagcatag ctgttggac 840
ccgaaagatg gtgaactatg cctgaatagg gtgaagccag aggaaacictt gggtgggtct 900
cgttagcggtt ctgacgtgca aatcgatgtt cgaatttggg tataggggcg aaagactaat 960
cgaaccatct agtagctggt tcctgccgaa gtttccctca ggatagcaga agctcgatc 1020
agttttatgtt ggtaaagcga atgattagaa gtcttgggtt tgaaatgacc ttaacttatt 1080
ctcaaacctt aaatatgtaa gaagtccttg ttgttaattt gaacgtggac aattgtatgtt 1140
agagcttttta gtggccatt ttggtaagc agaactggcg atgcgggatg aaccgaacgt 1200 40

ggggcacgtt taacgatcaa cttagaacttg gtacggacaa gggaatctg actgtcta 2160
taaaaacatag catttgtatg gtcagaaaatgt gaigtgtaca caatgtgatt tcgtccagt 2220
gtctgtaaatg tcaaagtgaa gaaattcaac caagcgcggg taaacggcg 10 gagtaactat 2280
gactcttcata aggttagccaa atgcctcgic atctaattag tgacgcgcata gaatggatta 2340
acgagattcc cactgtccct atctactatc tagcgaacc acagccaagg gaacggcgtt 2400
ggcagaatca gcggggaaag aagaccctgt tgagcttgac tctagtttga cattgtgaaa 2460
agacatggag gggtttagaat aagtgggagc ttccggcgccg gtgaaatacc actacccata 2520 20
tagttttttt acttattcaa tgaagcggag ctggaggtca aactccacgt tctagcatta 2580
agccctctgg gcgtatccggg ttgaagacat tgcaggtgg ggagtttggc tggggcggca 2640
catctgtttaa acgataacgc aggtgtccata agggggactc atggagaaca gaaatctcca 2700 30
gtagaacaaa agggtaaaag tccccttgtat ttgttttc agtgtgaata caaaccatga 2760
aagtgtggcc tatcgatcct ttagtccctc ggaatttgag gctagagggtt ccagaaaaatgt 2820
taccacaggg ataactggct tgcggcagtc aagcggtcat agcgacatgt ctttttgatt 2880
cttcgatgtc ggctttccatcataccga agcagaattc ggtaagcggtt ggattgttca 2940 40

cccaactaata gggaacgtga gctgggittt gaccgtcgta agacaggita gttttaccct 3000
actgatgaat gttatcgcaa tagtaattga acittagtacg agaggaaccg ttcattcaga 3060
taattggittt ttgcggctgt ctgatcaggc aacgcgcgaa gctaccatct gctggattat 3120
ggctgaacgc ctcttaagtca gaatccatgc tagaacgcga tgatTTTgc cctgcacatt 3180 10
tttagatggat acgaataaga ctTTTtagtc gctggaccat agcaggctgg caacggcgc 3240
cttagcggaa aggctttgtg cgcttgccgg cggatagcaa tgtcaacatg cgcggggata 3300
aatccTTTgc atacgactta gatgtacaac ggagtattgt aagcagttaga gtacgcTTgt 3360
tgTTacgatc tgctgagatt aagctttgt tgctgattt gtctaaagaag acctgcccga 3420
aggggggtctg ttttagcatag gc 3442

〈210〉 2

〈211〉 24

80

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 Designed DNA based on Candida albicans 28S ribosomal RNA gene

〈400〉 2

40

gattgcctca gtacggcga gtga

24

〈210〉 3

〈211〉 24

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial

10

〈220〉

〈223〉 Designed DNA based on Candida albicans 28S ribosomal RNA gene

〈400〉 3

gattgcctca gtagcggcga gtga

24

20

〈210〉 4

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 Designed DNA based on Candida albicans 28S ribosomal RNA gene

30

〈400〉 4

agtgtatcgaa agatgaaaag

20

〈210〉 5

〈211〉 17

〈212〉 DNA

40

〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 Designed DNA based on *Candida albicans* 28S ribosomal RNA gene

〈400〉 5

gtccgttgtt caagacg

17

10

【図面の簡単な説明】

【図1】真菌の系統解析を示す図である。（実験例3）

【図2】各菌種の融解温度を示す図である。（実験例2）

【図3】ライトサイクターによる増幅曲線を示す図である。*Aspergillus fumigatus*（実験例4）

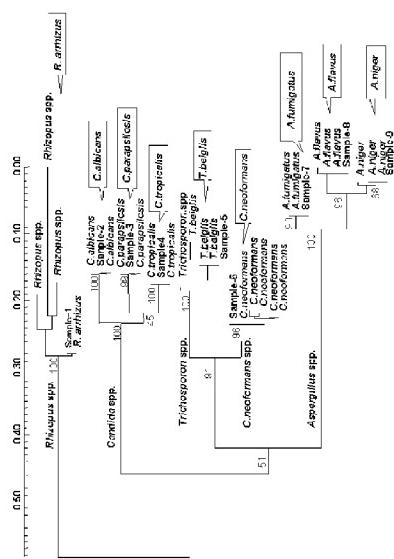
【図4】ライトサイクターによる増幅曲線を示す図である。*Cryptococcus neoformans*（実験例5）

【符号の説明】

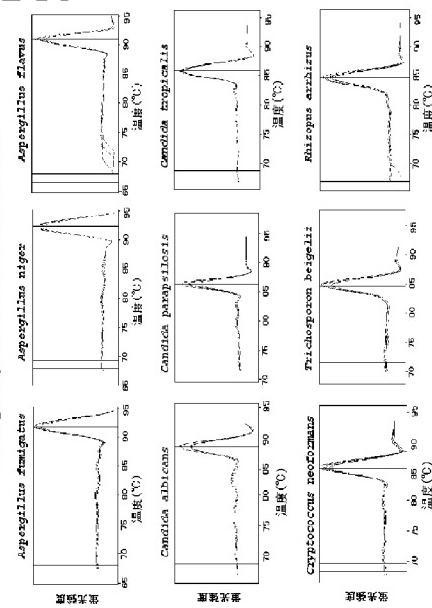
20

- ▲ 1 ▼ スタンダード 1
- ▲ 2 ▼ スタンダード 1
- ▲ 3 ▼ スタンダード 1
- ▲ 4 ▼ スタンダード 1
- ▲ 6 ▼ 試料 1
- ▲ 7 ▼ 試料 2
- ▲ 9 ▼ 陽性コントロール

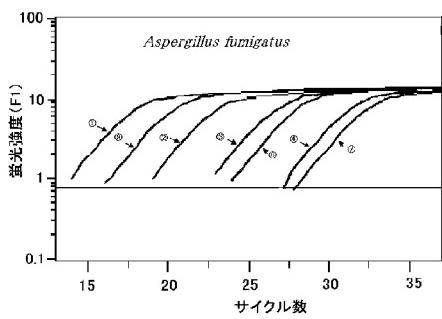
【 図 1 】



【四 2】



【 义 3 】



【圖 4】

